

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE UNA CEPA DE *Serratia marcescens* DEGRADADORA DE ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXYACÉTICO (2,4-D)

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF A STRAIN OF *Serratia marcescens* CAPABLE OF DEGRADING 2,4-DICHLOROPHENOXYACETIC ACID (2,4-D)

Gómez de Jesús, A.^{1*}; Rosales-Esquinca, M.A.²; Lizardi-Jiménez, M.³; Treviño-Quintanilla, G.⁴;
Reyes-Reyes, C.⁵; Castañón-González, H.⁶; Barrales-Cureño, H.⁷

¹CONACYT-Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad Autónoma de Chiapas. Villaflores, Chiapas. ²Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad Autónoma de Chiapas. Villaflores, Chiapas. ³CONACYT-Instituto Tecnológico Superior de Tierra Blanca. Tierra Blanca, Veracruz. ⁴Departamento de Tecnología Ambiental, Universidad Politécnica del Estado de Morelos. Jiutepec, Morelos. ⁵División de Informática. Tecnológico de Estudios Superiores de San Felipe del Progreso. San Felipe del Progreso, Estado de México. ⁶Departamento de Química y Bioquímica. Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. ⁷División de Procesos Naturales. Ingeniería Forestal Comunitaria. Universidad Intercultural del Estado de Puebla. Puebla, Puebla.

*Autor para correspondencia: agomezdj@conacyt.mx

RESUMEN

El ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) ha sido uno de los herbicidas más empleados globalmente desde hace más de 60 años, con el impacto ambiental que esto supone. En este trabajo se aisló una cepa bacteriana capaz de degradar el herbicida y con potencial para ser empleada en procesos de bioenriquecimiento de sitios impactados por este contaminante. Mediante la secuenciación del gen 16S rRNA se logró la identificación del género y la especie de la cepa bacteriana. Este es el primer reporte de aislamiento en México de una cepa de *Serratia marcescens* con esta característica.

Palabras clave: Agroquímicos como contaminantes, biorremediación, cultivo de enriquecimiento.

ABSTRACT

2,4-dichlorophenoxyacetic acid has been one of the most globally used herbicides for more than 60 years, with the environmental impact that this implies. In this work, a strain capable of degrading the herbicide and with potential to be employed in bioenrichment processes of impacted sites by this pollutant was isolated. 16s rRNA gene sequencing allowed identification of the genus and species of the bacterial strain. This is the first report of isolation in Mexico of a strain of *Serratia marcescens* with this capability.

Keywords: Agrochemicals as pollutants, bioremediation, enrichment culture technique.

Agroproductividad: Vol. 11, Núm. 4, abril. 2018. pp: 118-123.

Recibido: marzo, 2018. **Aceptado:** abril, 2018.

INTRODUCCIÓN

El estado de Chiapas tiene una superficie de 7.4 millones de hectáreas, de las cuales aproximadamente el 50% están destinada a la agricultura. De los cultivos estatales, el del maíz ocupa el mayor porcentaje de la superficie sembrada (75%) y por el valor económico de su producción, tiene el primer lugar dentro del sector (SAGARPA, 2010). En su cultivo se emplean diversos agroquímicos, algunos destinados al combate de insectos plaga y otros para el combate de malezas indeseables, como el paraquat, el glifosato y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Este último es uno de los herbicidas más ampliamente usados no sólo en Chiapas sino en el mundo (Marouani *et al.*, 2017) y ha sido empleado globalmente desde hace más de 60 años. La aplicación extensiva del 2,4-D y su alta hidrosolubilidad han causado contaminación en cuerpos de agua (superficiales y subterráneos), suelos y aire (Kumar *et al.*, 2016); no solo en las regiones donde ha sido aplicado intencionalmente, sino, por efecto de arrastre del viento y desplazamiento del agua, en sitios ajenos a los destinados al acondicionamiento con el agente defoliante. Se ha demostrado que el 2,4-D es un agente teratogénico, tóxico para los riñones e hígado, supresor del sistema inmunológico (Tuschl y Schwab, 2003) y está clasificado por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer como posible carcinogénico a humanos (Samir *et al.*, 2015); también se conoce su efecto como disruptor endócrino (Marouani *et al.*, 2017). Aunado a los riesgos a la salud humana, el herbicida también representa un riesgo para la diversidad biológica, pues tiene efectos sobre poblaciones que no son el objetivo de su aplicación. Entre las poblaciones no objetivo sobresale la microbiota del suelo, pues desempeña un papel trascendental en la preservación de la calidad del mismo (mantiene la disponibilidad de nutrientes y el ciclo de elementos mediante la descomposición de la materia orgánica), lo que se refleja directamente en su fertilidad (Zhang *et al.*, 2010). Esta comunidad microbiana responde a los cambios ambientales asociados a la aplicación de los herbicidas y se han reportado ya reducción de su biodiversidad en general (Gonod *et al.*, 2006), disminución de bacterias heterotróficas incluyendo bacterias desnitrificantes y alteración del equilibrio entre sus diversas poblaciones; lo que en conjunto afecta a las tasas de descomposición de materia orgánica (Singh y Singh, 2016).

Con el objetivo de eliminar los residuos indeseables del 2,4-D del ambiente, se han desarrollado diversos proce-

sos tecnológicos, siendo la biorremediación uno ellos. Un factor necesario para desarrollar un proceso de biorremediación exitoso es contar con el microorganismo adecuado para condiciones ambientales particulares (Boopathy, 2000), y aunque ya se han aislado múltiples cepas capaces de biodegradar *ex situ* el 2,4-D, también muchos de esos mismos estudios reportaron que una vez introducida la cepa en un ambiente ajeno no mantuvo ni su viabilidad ni actividad, resultando en procesos de bioenriquecimiento no funcionales a lo largo del tiempo (Dai *et al.*, 2015; Xia *et al.*, 2016). Por ende, el empleo de una cepa nativa competente puede ser el factor determinante del buen funcionamiento de un proceso *in situ* de biorremediación. El objetivo de este trabajo fue aislar, de muestras de suelo agrícola con largo historial de aplicación del 2,4-D, mediante la técnica de cultivo de enriquecimiento, una cepa nativa capaz de degradar el 2,4-D y con potencial para ser empleada en procesos de bioenriquecimiento de los suelos y cuerpos de agua de la región.

MATERIALES Y MÉTODOS

Compuestos químicos

Se usó el reactivo analítico ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), con 98% de pureza, para preparar las soluciones de concentración conocida de las curvas de calibración. La solución acuosa comercial de la sal dimetilamina del ácido 2, 4-diclorofenoxiacético, empleada en los medios de cultivo, fue de la marca UNIAMINA 480 de la compañía United Phosphorus de México (Álvaro Obregón, Ciudad de México, México) El resto de los reactivos fueron de grado analítico y el agua empleada fue destilada. Los solventes empleados para preparar la fase móvil de los análisis por HPLC fueron del correspondiente grado de pureza.

Medios de cultivo

Los ensayos de biodegradación fueron desarrollados empleando medio líquido mineral (MLM), adicionado con diferentes volúmenes de la solución acuosa comercial del 2,4-D como única fuente de carbono y energía. La composición del MLM fue, en g L⁻¹, de 3 de K₂HPO₄ y de KH₂PO₄, 1 de (NH₄)₂SO₄, 0.0005 de CaCl₂ y de MgSO₄ y 0.000125 de CuSO₄, MnSO₄, CoCl₂, (NH₄)₆Mo₇O₂, H₃BO₃, ZnSO₄, y FeSO₄. El pH final del medio fue de 7±0.1 unidades.

Aislamiento de la cepa por cultivo de enriquecimiento

Se colectaron muestras de 1 kg de suelo agrícola (de

0 a 10 cm de profundidad) de 10 sitios históricamente tratados con el agente defoliante. De cada muestra homogeneizada se colocaron 10 g en matraces Erlenmeyer de 1 L de capacidad con 250 mL de MLM estéril con una concentración de 100 mg L^{-1} de 2,4-D. Los cultivos se mantuvieron a temperatura constante ($35 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$) en un agitador orbital a 150 rpm por 72 h. Transcurrido esa primera etapa, se transfirieron frente a mechero 10 mL de sobrenadante de cada matraz a nuevos matraces con la misma cantidad y composición del MLM original. Se continuó el proceso de enriquecimiento (resiembra del cultivo anterior en medio fresco cada 72 horas) hasta que se apreció incremento en la turbiedad asociada a crecimiento microbiano en los matraces; de ellos, sus microorganismos fueron cultivados (por estría cruzada) sobre placas de agar con 2,4-D como única fuente de carbono y se observó si había colonización. Cuando ocurrió así, las placas con crecimiento se refrigeraron para usar esos microorganismos en los experimentos siguientes de identificación y biodegradación.

Identificación de la cepa degradadora de 2,4-D

La cepa degradadora fue identificada mediante la secuenciación del gen 16S rRNA, el cual se amplificó mediante PCR utilizando los cebadores eubacterianos: 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 142R (5'-ACGGC-TACCTTGTTACGACTT-30) y una DreamTaq Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, EUA). La secuenciación de ADN se realizó en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología de la UNAM, y se realizó una búsqueda a través de BLAST para identificar género y especie del microorganismo (Altschul *et al.*, 1997).

Acondicionamiento del inóculo para las cinéticas

Con una asada de una colonia de la cepa mantenida en refrigeración, se inocularon frente a mechero 100 mL de MLM estéril con 100 mg L^{-1} de 2,4-D en matraces de 500 mL y se incubaron a $35 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, con una agitación orbital de 150 rpm por 24 h. Transcurrido ese tiempo se cuantificó por espectrofotometría la concentración de biomasa y de 2,4-D.

Cuantificación espectrofotométrica de biomasa formada y de 2,4-D residual

La concentración de biomasa se estimó por la absorbancia de luz, de 600 nm de longitud de onda, de la suspensión celular (Péquignot *et al.*, 1998). El 2,4-D residual se cuantificó por la absorbancia de luz, de 285 nm de longitud de onda, del sobrenadante clarificado de

las suspensiones celulares centrifugadas a 10000 rpm por 10 min (González *et al.*, 2012). Se utilizó para estas pruebas un espectrofotómetro marca Thermo Scientific, modelo GENESYS 10S UV-Vis (Waltham, MA, EUA). La curva de calibración se realizó con soluciones de concentración conocida de 2,4-D.

Cinética por lote de degradación del 2,4-D y de formación de biomasa

En un matraz Erlenmeyer de 1 L, se colocaron 250 mL de MLM estéril con una concentración aproximada de 90 o 140 mg L^{-1} de 2,4-D. A este sistema se adicionaron frente a mechero 10 mL del cultivo previamente acondicionado como inóculo y se mantuvo a temperatura constante de $35 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ con agitación orbital de 150 rpm. Inmediatamente después de la adición y cada 90 minutos se colectaron frente a mechero 7 mL de muestra para cuantificar biomasa formada, 2,4-D residual y DQO.

Cuantificación de la demanda química de oxígeno (DQO)

Una medida indirecta de la degradación de todos los compuestos orgánicos provenientes de la formulación comercial del 2,4-D es la disminución en la demanda química de oxígeno (DQO) de las muestras (González-Cuna *et al.*, 2016). La DQO se midió aplicando el método de oxidación por dicromato en medio ácido, establecido en la NMX-AA-030/2-SCFI-2011 (SE, 2011), usando para los análisis los sobrenadantes clarificados de las muestras centrifugadas. La curva de calibración se realizó con soluciones de concentración conocida de biftalato de potasio.

Cuantificación por HPLC del 2,4-D residual

La cuantificación del herbicida se realizó con un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) marca Shimadzu, modelo SPD-10A (Columbia, MD, EUA), equipado con un detector UV ajustado a 280 nm y con una columna marca LiChrospher modelo 100 RP-18, bajo las condiciones descritas por González-Cuna *et al.* (2016). La fase móvil estaba compuesta de dos soluciones; agua con 1% de ácido acético y metanol también con un 1% de ácido acético, en proporción 40:60, respectivamente. La curva de calibración se realizó con soluciones de concentración conocida de 2,4-D.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de una cepa bacteriana capaz de usar el 2,4-D como fuente de carbono y energía.

Tras 5 resiembras del cultivo de enriquecimiento sólo una de las muestras mostró crecimiento bacteriano y simultánea disminución de la concentración de 2,4-D. Tras una octava reinoculación en MLM, ese cultivo fue sembrado en cajas Petri con 2% de agar y la misma concentración de nutrientes y 2,4-D que el MLM, por estría cruzada y por dilución, dejándose propagar por 48 horas a 35 ± 2 °C. La uniformidad de la morfología colonial del crecimiento sugirió la existencia de una sola cepa, la cual se conservó en las cajas para los experimentos posteriores de identificación y biodegradación.

Identificación de la cepa degradadora de 2,4-D

La cepa degradadora de 2,4-D fue sembrada por dilución y por estría cruzada en placas con agar medio mínimo mineral, con 100 mg L^{-1} de 2,4-D y se incubaron a 30 ± 2 °C. Se apreció el crecimiento de una colonia rojiza que se empleó para la secuenciación del gen *16S rRNA*. La secuencia presentó un 99% de identidad con cepas del género *Serratia*, en cuanto a la especie tuvo mayor identidad con *marcescens*. Se han reportado cepas degradadoras de los géneros *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Cupriavidus*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Enterobacter*, *Variovorax*, *Delftia*, *Burkholderia*, *Sphingomonas*, *Comamonas*, *Acinetobacter*, *Klebsiella*, *Bradyrhizobium* (Dai et al., 2015; Kumar et al., 2016; Singh y Singh, 2016; Xia et al., 2016). Silva et al. (2007) aisló e identificó una cepa de *Serratia marcescens* capaz de degradar el herbicida. Hasta la fecha de elaboración de este escrito, a nivel mundial, el de Silva et al. (2007) era el único reporte de una cepa de *Serratia marcescens* capaz de degradar el ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

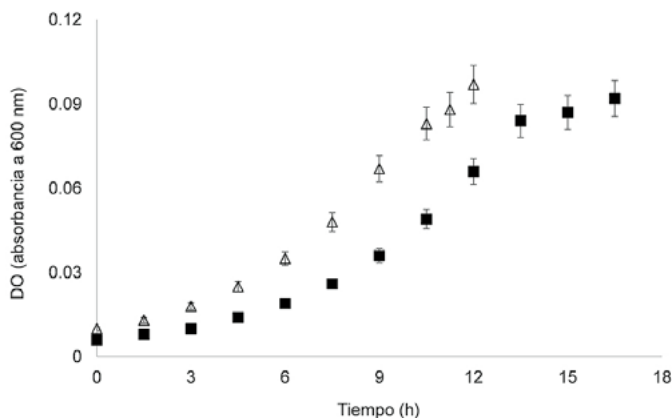


Figura 1. Cinéticas de crecimiento microbiano en cultivo por lote a 90 (Δ) y 140 (\blacksquare) mg L^{-1} de concentración inicial de 2,4-D. Las barras de error representan el 7% de variación máxima que se presentó entre los triplicados de los ensayos.

Biodegradación del 2,4-D en cultivo por lote usando MLM

Para corroborar y evaluar parcialmente la capacidad de la cepa aislada, se desarrollaron por triplicado, dos cinéticas de formación de biomasa y de remoción de 2,4-D y de DQO bajo las condiciones previamente descritas. En la Figura 1 se muestra el perfil de ambas cinéticas de formación de biomasa. No se presentaron cambios significativos en el valor del pH al cabo de las cinéticas. Se observó que ambas curvas describen un perfil sigmoideo típico del crecimiento bacteriano en cultivo por lote con un solo sustrato limitante. Los datos experimentales fueron ajustados al modelo logístico de crecimiento (Zwietering et al., 1990) para calcular el valor máximo de velocidad específica de crecimiento (μ_{max}) para cada concentración inicial de sustrato. Las curvas experimentales tuvieron un R^2 de 0.9965 para la desarrollada inicialmente con 140 mg L^{-1} de 2,4-D y de 0.9956 para la de 90 mg L^{-1} con respecto a los valores correspondientes calculados con el modelo matemático (Figura 2). Los valores de μ_{max} fueron de 0.260 y 0.290 h^{-1} (tiempos de duplicación de 2.67 y 2.42 h, correspondientemente) para la de 140 mg L^{-1} y la de 90 mg L^{-1} , respectivamente.

En la Figura 3 se presentan las cinéticas de remoción de 2,4-D correspondientes a las cinéticas de síntesis de biomasa que se han discutido. En cuanto a la eficiencia de remoción de 2,4-D, ésta fue de 91.07% y de 92.10% para las cinéticas de 90 y 140 mg L^{-1} de 2,4-D inicial, respectivamente. No se observó diferencia estadísticamente significativa entre los valores de eficiencia de ambas cinéticas, también se observó que aunque es un

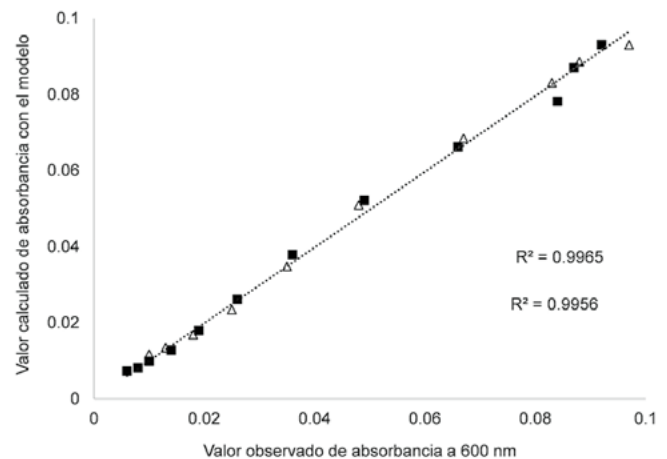


Figura 2. Correlación entre los valores experimentales (de absorbancia a 600 nm) y los calculados usando el modelo logístico de crecimiento, a 90 (Δ) y 140 (\blacksquare) mg L^{-1} de concentración inicial.

valor alto, es inferior a los reportados por González et al. (2012), Xia et al. (2016) y Zabaloy y Gómez (2014), que fueron de 99.9%, 100% y 100%, para cinéticas desarrolladas a 100, 200 y 250 mg L⁻¹ de 2,4-D, por 24, 32 y 72 horas, con cepas de *Delftia* sp., *Achromobacter* sp. y 10 cepas nativas de *Cupriavidus necator*, respectivamente. Con esta comparación, sobresale que la cepa de *Serratia marcescens* aislada en este trabajo logró eficiencias de eliminación superiores al 90% en menos de 24 horas. Para la velocidad volumétrica global de remoción de 2,4-D, ésta tuvo valores de 7.55 y 8.25 mg L⁻¹ h⁻¹ para las cinéticas de 90 y 140 mg L⁻¹ de 2,4-D inicial, respectivamente. En la Figura 4 se presentan las cinéticas de remoción de DQO correspondientes a las cinéticas de síntesis de biomasa que se han analizado. Los perfiles de ambas cinéticas de remoción son prácticamente iguales a los que se presentaron cuando se analizó 2,4-D exclusivamente. Tal comportamiento sincronizado indicó que la presencia de los aditivos de la formulación comercial del herbicida no inhibió la biodegradación de la molécula de 2,4-D.

CONCLUSIONES

Se aisló una cepa bacteriana nativa de suelo agrícola, capaz de utilizar como única fuente de carbono y energía el 2,4-D, y se logró también su identificación por secuenciación del gen *16S rRNA*. Este es el primer reporte de aislamiento en México de una cepa de la bacteria *Serratia marcescens* nativa con esta característica. En las concentraciones ensayadas, la cepa incrementó su tiempo de duplicación de 2.42 h (a baja concentración) a 2.67 h (para la

concentración alta). La cepa degradó hasta 8.25 mg L⁻¹ h⁻¹ de 2,4-D con una eficiencia del de 92.1% tras 16 horas de cultivo. Las curvas de reducción de la DQO mostraron que la cepa fue capaz de degradar el herbicida en presencia de los otros componentes de la formulación comercial usada, con una eficiencia de remoción de DQO del 88.81% después de 16 horas de cultivo. Se trata de una cepa con potencial para ser utilizada en procesos de biorremediación *in situ* de suelos y cuerpos de agua y *ex situ* de aguas residuales de riego contaminadas con el herbicida, por lo que se debe estudiar su desempeño en cultivos continuo y por lote alimentado, así como su capacidad para formar biopelículas útiles para biorreactores de lecho empacado.

LITERATURA CITADA

- Altschul S. F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucl. Acids Res. 25: 3389–3402. doi: 10.1093/nar/25.17.3389
- Boopathy R. 2000. Factors limiting bioremediation technologies. Bioresour. Technol. 74: 63–67. doi: 10.1016/S0960-8524(99)00144-3
- Dai Y., Li N., Zhao Q., Xie S. 2015. Bioremediation using *Novosphingobium* strain DY4 for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-contaminated soil and impact on microbial community structure. Biodegradation 26: 161–170. doi: 10.1007/s10532-015-9724-7
- Gonod L.V., Martin-Laurent F., Chenu C. 2006. 2,4-D impact on bacterial communities, and the activity and genetic potential of 2, 4-D degrading communities in soil. FEMS Microbiol. Ecol. 58: 529–537. doi: 10.1111/j.1574-6941.2006.00159.x
- González-Cuna S., Galíndez-Mayer J., Ruiz-Ordaz N., Murugesan S., Piña-Escobedo A., García-Mena J., Santoyo-Tepole F. 2016. Aerobic biofilm reactor for treating a commercial formulation of the herbicides 2, 4-D and dicamba: Biodegradation kinetics and

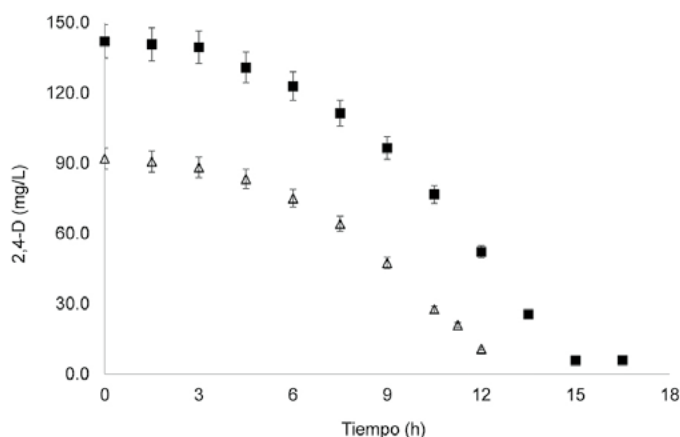


Figura 3. Cinéticas de degradación de 2,4-D en cultivo por lote, a 90 (Δ) y 40 (■) mg L⁻¹ de concentración inicial. Las barras de error representan el 5% de variación máxima que se presentó entre los triplicados de los ensayos.

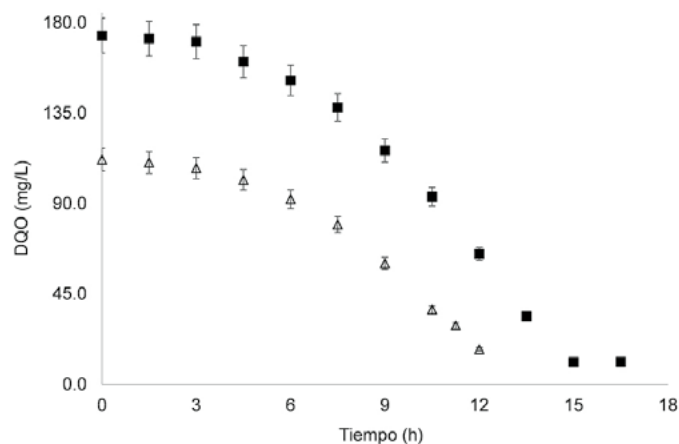


Figura 4. Cinéticas de remoción de DQO en cultivo por lote, a 90 (Δ) y 140 (■) mg L⁻¹ de concentración inicial de 2,4-D. Las barras de error representan el 5% de variación máxima que se presentó entre los triplicados de los ensayos.

- biofilm bacterial diversity. Int. Biodeterior. Biodegradation 107: 123-131. doi: 10.1016/j.ibiod.2015.11.014
- González A.J., Gallego A., Gemini V.L., Papalia M., Radice M., Gutkind, G., Korol S.E. 2012. Degradation and detoxification of the herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) by an indigenous *Delftia* sp. strain in batch and continuous systems. Int. Biodeterior. Biodegradation 66: 8-13. doi: 10.1016/j.ibiod.2011.09.010
- Kumar A., Trefault N., Olufolahan A. 2016. Microbial degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid: Insight into the enzymes and catabolic genes involved, their regulation and biotechnological implications. Crit. Rev. Microbiol. 42: 194-208. doi: 10.3109/1040841X.2014.917068
- Marouani N., Tebourbi O., Cherif D., Hallegue D., Tahar Y., Sakly M., Benkhalifa M., Ben R. 2017. Effects of oral administration of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) on reproductive parameters in male Wistar rats. Environ. Sci. Pollut. Res. 24: 519-526. doi: 10.1007/s11356-016-7656-3
- Péquignot C., Larroche C., Gros J. B. 1998. A spectrophotometric method for determination of bacterial biomass in the presence of a polymer. Biotechnol. Tech. 12: 899-903. doi: 10.1023/A:1008865512272
- SAGARPA. 2010. Diagnóstico sectorial del Estado de Chiapas. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México, 120 pp.
- Samir R., Essam T., Ragab Y., Hashem A. 2015. Enhanced photocatalytic-biological degradation of 2,4 dichlorophenoxyacetic acid. Bull. Fac. Pharm. 53: 77-82. doi: 10.1016/j.bfopcu.2015.03.002
- SE. 2011. Norma mexicana NMX-AA-030/2-SCFI-2011. Análisis de agua-determinación de la demanda química de oxígeno en aguas naturales, residuales y residuales tratadas-método de prueba. Secretaría de Economía. Dirección General de Normas. 27 de mayo del 2013.
- Silva T.M., Stets M.I., Mazzetto A.M., Andrade F.D., Pileggi S.A.V., Fávero P.R., Cantú M.D., Carrilho E., Carneiro P.I.B., Pileggi M. 2007. Degradation of 2,4-D herbicide by microorganisms isolated from brazilian contaminated soil. Braz. J. Microbiol. 38: 522-525. doi: 10.1590/S1517-83822007000300026
- Singh B., Singh K. 2016. Microbial degradation of herbicides. Crit. Rev. Microbiol. 42: 245-261. doi: 10.3109/1040841X.2014.929564
- Tuschl H., Schwab C. 2003. Cytotoxic effects of the herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid in HepG2 cells. Food Chem. Toxicol. 41: 385-393. doi: 10.1016/S0278-6915(02)00238-7
- Xia Z. Y., Zhang L., Zhao Y., Yan X., Li S. P., Gu T., Jiang J. D. 2016. Biodegradation of the herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid by a new isolated strain of *Achromobacter* sp. LZ35. Curr. Microbiol. 74: 193-202. doi: 10.1007/s00284-016-1173-y
- Zabaloy M.C., Gómez M.A. 2014. Isolation and characterization of indigenous 2,4-D herbicide degrading bacteria from an agricultural soil in proximity of Sauce Grande River, Argentina. Ann. Microbiol. 64: 969-974. doi: 10.1007/s13213-013-0731-9
- Zhang C., Liu X., Dong F., Xu J., Zheng Y., Li J. 2010. Soil microbial communities response to herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid butyl ester. Eur. J. Soil Biol. 46: 175-180. doi: 10.1016/j.ejsobi.2009.12.005
- Zwietering M. H., Jongenburger I., Rombouts F. M., Van't Riet K. 1990. Modeling of the bacterial growth curve. Appl. Environ. Microbiol. 56: 1875-1881.

